



NEF ACTION SUPPRESSANT

Patent number: JP11139977
Publication date: 1999-05-25
Inventor: KONISHI JINEMON; FUJII YOICHI
Applicant: NIPPON ZOKI PHARMACEUTICAL CO
Classification:
- international: A61K35/36; A61K35/36
- european:
Application number: JP19970322096 19971107
Priority number(s): JP19970322096 19971107

Also published as:

 EP0916344 (A2)
 EP0916344 (A3)

Report a data error here

Abstract of JP11139977

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an AIDS onset suppressant having slight adverse effect and administrable for a long period, specifically an Nef action suppressant such as Nef protein-Nef receptor-binding suppressant or Nef receptor expression suppressant. **SOLUTION:** This Nef action suppressant contains an extract of inflammation tissue inoculated with vaccinia virus as an active ingredient. The extract of inflammation tissue inoculated with vaccinia virus is highly useful as a new medicine based on a new action mechanism suppressing the onset of AIDS through Nef and further high therapeutic effect can be expected by combinedly using the extract with a virus proliferation suppressant such as reverse transcriptase suppressant or protease suppressant.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-139977

(43) 公開日 平成11年(1999) 5月25日

(51) Int.Cl.⁸

A 6 1 K 35/36

識別記号

A E D

A D Y

F I

A 6 1 K 35/36

A E D

A D Y

審査請求 未請求 請求項の数 4 F D (全 4 頁)

(21) 出願番号

特願平9-322096

(22) 出願日

平成 9 年 (1997) 11 月 7 日

(71) 出願人 000231796

日本臓器製薬株式会社

大阪府大阪市中央区平野町 2 丁目 1 番 2 号

(72) 発明者

小西 甚右衛門

東京都武蔵野市吉祥寺東町 3 丁目 21 番 13 号

(72) 発明者

藤井 陽一

愛知県名古屋市熱田区大宝 2 丁目 4 番 43 号

(74) 代理人

弁理士 村山 佐武郎

(54) 【発明の名称】 N e f 作用抑制剤

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 副作用が少なく長期投与可能なエイズ発症抑制剤、具体的には N e f 蛋白質-N e f 受容体結合抑制剤、N e f 受容体発現抑制剤等の N e f 作用抑制剤を提供する。

【解決手段】 本発明 N e f 作用抑制剤の有効成分はワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物である。

【効果】 ワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物は N e f を介してエイズ発症を抑制するという新規な作用機序にもとづく新薬剤として有用性の高いものであり、逆転写酵素阻害薬やプロテアーゼ阻害薬等のウイルス増殖阻止剤との併用にてさらに高い治療効果が期待できるものである。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物を有効成分として含有するNef作用抑制剤。

【請求項2】 Nef蛋白質とNef受容体の結合抑制剤である請求項1記載のNef作用抑制剤。

【請求項3】 Nef受容体発現抑制剤である請求項1記載のNef作用抑制剤。

【請求項4】 逆転写酵素阻害薬及び／又はプロテアーゼ阻害薬と併用して用いる請求項1、2又は3記載のNef作用抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物の新規な薬理作用に関するものであり、具体的にはワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物を有効成分として含有するNef蛋白質-Nef受容体結合抑制剤、Nef受容体発現抑制剤等のNef作用抑制剤に関する。

【0002】

【従来の技術】レトロウイルスは一般に構造蛋白質（Gag、Pol、Env）を共通の骨格としているが、これに加え調節蛋白質やアクセサリ蛋白質を種特異的な蛋白質として持つ複雑なウイルスがヒト免疫不全ウイルス（human immunodeficiency virus：HIV）である。Nefはアクセサリ蛋白質の一つで、ウイルス複製サイクル初期に合成され、HIV-1、HIV-2及びSIV（サル免疫不全ウイルス）に特異的な蛋白質である。Nefは発見当初はウイルス複製効率を低下させるネガティブ因子（negative factor）であるとみなされNefと命名されたが、その後Nef欠損人工変異SIVのアカゲザルへの感染実験の研究結果などから、HIV複製の正の調節因子として働くことが示唆され、エイズ発症の鍵を握る重要な因子として再認識されている〔細胞工学、第16巻、第1号、94-99頁（1997年）〕。

【0003】上記の藤井らの論文に詳細に述べられているが、生体内におけるNefの主な機能は、①ウイルス複製の増強、②CD4ダウンレギュレーション、および③T細胞傷害能である。ウイルス感染に関しては、Nefは細胞膜結合性を有しウイルスの細胞への吸着・進入に必要であり、ウイルスDNA合成に関与することなどの知見が得られている。またT細胞傷害性については、末梢血および大腸リンパ節CD4⁺T細胞の表面に結合したNefを抗Nef抗体によりクロスリンクするとアポトーシスが起ることなどから、HIV患者におけるCD4⁺T細胞の消失へのNefの関与、即ちエイズ発症にはNefとCD4⁺T細胞上のNef受容体との結合が深く関与していることが強く示唆されている。さらにNefがサイトカインの産生に影響を及ぼし免疫を抑制していることを示唆する報告もある。

【0004】現在使用・開発中のエイズ治療薬は、アジドチミジン、ddI等の逆転写酵素阻害薬とプロテアーゼ阻害薬が主であり、これらはウイルスそのものの増殖を阻止する薬剤である。その他には、エイズにより低下した免疫機能を増加させる免疫増強剤やエイズに伴う日和見感染症や悪性腫瘍に対する対処療法を目的とした化学療法剤がある。上述したNefに関する知見をもとに、Nef誘導によるT細胞死を阻止しエイズ発症を抑制する薬剤が、上記逆転写酵素阻害薬やプロテアーゼ阻害薬とは異なった作用機序による別種の新規なエイズ発症抑制薬として注目を集め始めている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】既知のエイズ治療薬である逆転写酵素阻害薬やプロテアーゼ阻害薬は強い副作用と薬剤耐性ウイルスの出現が最も問題とされているが、HIV及びSIVに特異的であるNefを介したエイズ発症抑制薬は、既知のウイルス増殖阻害薬に比べて副作用が低い、或いは薬剤耐性ウイルスへの変異に対応できる等の可能性があり、このような新規な作用機序に基づくエイズ治療薬、特に副作用が少なく長期投与可能な薬剤の開発が望まれている。本発明者らは、ワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物の薬理活性に関して種々の試験研究を行った結果、該物質が優れたNefとNef受容体との結合抑制作用並びにNef受容体の発現抑制作用を有することを見出した。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明の目的は、副作用が少なく長期投与可能なエイズ発症抑制剤、具体的にはNef蛋白質結合抑制剤、Nef受容体発現抑制剤等の医薬を提供することにある。

【0007】

【発明の実施の形態】ウイルス等の外界からの侵襲や内的な病態状態の進行に対して、過剰反応に対する抑制作用と機能低下に対する増強作用という二相性をもって生体はその恒常性を維持し、生体機能を調整し正常化するために種々の生体機能調整物質を産生することが知られている。例えばワクシニアウイルスを接種した炎症組織において産生される生体機能調整物質、該物質を病態組織から抽出する製造方法並びにそれらの薬理活性については種々報告されている（特公昭63-39572号公報、特公昭63-25600号公報、特公平3-43279号公報、特許第2594222号公報など）。

【0008】また実際の医薬品としてはワクシニアウイルス接種家兔炎症皮膚抽出物製剤がある。この製剤は例えば医療薬日本医薬品集（1994年8月版、日本医薬情報センター編、薬業時報社発行）の1434頁に記載されているように、ワクシニアウイルスを接種した家兔の炎症皮膚組織から抽出分離した非蛋白性の活性物質を含有する薬剤であり、腰痛症、頸肩腕症候群、肩関節周囲炎、変形性関節症、症候性神経痛、皮膚疾患（湿疹、

皮膚炎、じんま疹)に伴う掻痒、アレルギー性鼻炎、スモン後遺症状の冷感、痛み、異常知覚等に対する適応が認められており、皮下、筋注、静注用の注射剤並びに錠剤が医療用医薬品として製造承認を受けて市販されている。

【0009】本発明Nef蛋白質結合抑制剤並びにNef受容体発現抑制剤医薬の有効成分は上述したようなワクシニアウイルス接種炎症組織から抽出した非蛋白性の生体機能調整物質であり、前記の医療薬日本医薬品集にも掲載されているワクシニアウイルス接種家兔炎症皮膚抽出物製剤は医薬品の製造承認を受け市販されており入手可能である。また上述した特許公報等の文献に記載されている種々のワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物が本発明物質として利用でき、それらの製造方法や好ましい投与量なども文献中に説明されている。

【0010】患者に対する投与方法は、注射剤による皮下、筋注、静注投与並びに錠剤による経口投与が市販薬剤では認められているが、その他疾患の種類に応じて、その治療に最適な上記以外の剤形による投与方法も可能である。投与量はワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物の種類によって適宜設定すべきであるが、市販製剤で認められている投与量は、前記の医療薬日本医薬品集(1434頁)によれば、基本的には内服では1日16ノイロトロピン単位(NU)、注射剤では1日3.6乃

被検薬濃度 (NU/mL)	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.006
結合率 (%)	54	62	70	92	100

【0014】(2) T細胞表面上のNef受容体発現に対する抑制作用

5.0 μ LのMolt-4クローンNo. 8細胞(1×10^6)に各種濃度の被検薬(0.1 mL)を添加し、96穴マイクロプレートで10%ウシ胎児血清添加RPMI-1640培地で37℃、72時間培養した。細胞を洗浄した後、抗Nef受容体モノクローン抗体(10 μ g)と20 μ Lの0.1%ウシ血清アルブミン含有PBSに浮遊した細胞を4℃で30分間反応した。洗浄後、

被検薬濃度 (NU/mL)	0.05	0.025	0.0125	0.006	0.003
Nef受容体発現率 (%)	82	85	93	99	101

【0016】(3) HIV-1合胞体形成に対する阻害作用

Nef受容体陽性である50 μ Lの非感染Molt-4クローンNo. 8細胞(1×10^5)を、Nef蛋白質が細胞表面に発現している50 μ LのHIV-1(LAV-1株)持続感染Molt-4細胞(5×10^4)とともに96穴マイクロプレートで37℃、48時間培養し、

至7.2 NUを投与するよう医療用医薬品としては示されているが、疾患の種類、重症度、患者の個人差、投与方法、投与期間等によって適宜増減可能である。

【0011】以下に、ワクシニアウイルス接種炎症組織抽出物の新規な薬理作用に関する薬理試験結果を示す。

【0012】

【実施例】(1) NefのT細胞表面のNef受容体への結合抑制作用

100 μ LのMolt-4クローンNo. 8細胞(1×10^6)と100 μ Lの精製されたバキュロウイルス遺伝子合成Nef蛋白質(300 μ g/mL)を4℃で1時間反応させた。同様の操作を、各種濃度の被検薬(0.1 mL)を添加した試験系で行った。次に0.5%ウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝液(PBS)で細胞を洗浄し、ウサギ抗Nef蛋白質IgG抗体で4℃で1時間反応後、細胞を洗浄した。最後に、細胞をFITC標識ヤギ抗ウサギIgG抗体で4℃、30分間反応し、洗浄後FACS-Caliber(ベクトン・ディッキンソン社製)で陽性細胞数を測定した。

【0013】結果の一例を表1に示すが、本発明物質(ワクシニアウイルス接種炎症皮膚抽出物製剤：商品名ノイロトロピン)は用量依存的にNef蛋白質のT細胞表面への結合を抑制した。

【表1】

被検薬濃度 (NU/mL)	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.006
結合率 (%)	54	62	70	92	100

細胞をFITC標識したヤギ抗マウスIgM抗体で4℃、30分間反応し、洗浄後FACS-Caliber(ベクトン・ディッキンソン社製)で陽性細胞数を測定した。

【0015】表2に結果の一例を示す。その結果、被検薬(本発明物質)は用量依存的にT細胞表面上のNef受容体の発現を抑制した。

【表2】

被検薬濃度 (NU/mL)	0.05	0.025	0.0125	0.006	0.003
Nef受容体発現率 (%)	82	85	93	99	101

形成した合胞体の数を顕微鏡下で計測した。各種濃度の被検薬(0.1 mL)を培養開始時に添加して、被検薬の合胞体形成抑制作用を測定した。尚、被検薬の合胞体形成能は、被検薬添加試料での測定値を無添加試料での測定値で除して求めた。

【0017】上記HIV感染Molt-4細胞を用いたHIV-1合胞体形成に対して、特許第2594222

号公報の実施例1記載の製造方法に従って得た本発明物質は0.006~0.1mg/mLの濃度で用量依存的な抑制作用を示し、例えば0.1mg/mLで16%まで低下させた。

【0018】(4) HIV感染Molt-4細胞よりのウイルス産生に対する抑制作用

50 μ LのMolt-4クローンNo. 8細胞(1 \times 10⁵)と50 μ LのHIV-1(LAV-1株)をM.O.I.が0.02で37℃で1時間感染し、各種濃度の上記と同様の被検薬(0.1mL)を添加した後、10日間培養し、培養上清中のp24gag抗原量を測定してウイルス産生量を測定した。p24抗原はダイナボット社製のアボット抗原測定キット(ELISAキット)で測定した。

【0019】その結果、本発明物質は0.006~0.1mg/mLの濃度で用量依存的にHIV産生を抑制し、例えば0.1mg/mLで45%まで低下させた。

【0020】

【発明の効果】上記の薬理試験結果より明らかなよう

に、本発明物質はNef蛋白質のT細胞表面への結合を抑制する作用、並びにT細胞表面上のNef受容体の発現抑制作用を有することが示された。Nefはウイルスの複製増強や感染細胞の合胞体形成にも関与していることが示唆されており、本発明物質はこれらに対する抑制作用も上記の薬理試験結果の如く認められたことから、本発明物質はNefを介してエイズ発症を抑制するという新規な作用機序にもとづく新薬剤として有用性の高いものであることが示された。抗エイズ戦略として、各種の逆転写酵素阻害薬やプロテアーゼ阻害薬が開発されており、HIVの変異に対応するためそれらを複数組み合わせたカクテル療法も推進されているが、これらウイルスそのものの増殖阻止薬に加え新しい作用機序による薬剤が切望されており、本発明薬剤は新規なエイズ発症抑制薬として非常に期待されるものである。また本発明Nef作用抑制剤は逆転写酵素阻害薬やプロテアーゼ阻害薬等のウイルス増殖阻止剤との併用にてさらに高い治療効果が期待でき、非常に有用性の高いものである。